



⑬ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 44 43 902 C 1**

⑥ Int. Cl.⁸:
C 12 M 1/34
C 12 M 3/04

②① Aktenzeichen: P 44 43 902.4-41
②② Anmeldetag: 9. 12. 94
②③ Offenlegungstag: —
②⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 18. 4. 96

DE 44 43 902 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

③① Innere Priorität: ③② ③③ ③①
01.12.94 DE 44 42 797.2

⑦③ Patentinhaber:
Minuth, Will, Prof. Dr., 93077 Bad Abbach, DE

⑦④ Vertreter:
Wasmeier, A., Dipl.-Ing.; Graf, H., Dipl.-Ing.,
Pat.-Anwälte, 93055 Regensburg

⑦② Erfinder:
gleich Patentinhaber

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE 43 34 677 C1
DE 42 00 448 C2
DE 39 24 701 A1
DE-GM 19 94 760
WO 93 07 254 A1
JP 01-3 17 383 (Abstract);

⑤④ Kammer zur Kultivierung von Zellen, insbesondere Mikroskopkammer

⑤⑦ Die Erfindung bezieht sich auf eine neuartige Ausbildung einer Kammer zur Kultivierung von Zellen, insbesondere Mikroskopkammer, bestehend aus einem mehrteiligen Gehäuse mit wenigstens einem ersten Gehäuseteil und einem zweiten Gehäuseteil, die jeweils eine Bohrung oder Ausnehmung aufweisen, die bei geschlossenem Gehäuse achs- gleich angeordnet sind und jeweils einen Teil eines Innen- raumes der Kammer bilden, wobei in wenigstens einer Ausnehmung ein die Achse dieser Ausnehmung umschlie- ßender Dichtungsring vorgesehen ist, der gegen die Innen- fläche einer den Innenraum der Kammer nach außen abschließenden und ein Betrachtungsfenster bildenden Scheibe anliegt.

DE 44 43 902 C 1

Die Erfindung bezieht sich auf eine Kammer zur Kultivierung von Zellen und dabei speziell auf eine Kammer, die eine mikroskopische Beobachtung insbesondere von Langzeitzellkulturen ermöglicht.

Kammern für die Kultivierung von Zellen sind bekannt, insbesondere auch in der Form, daß eine solche Kammer in zwei Teilkammern oder in zwei Teilräume unterteilt ist, zwischen denen ein Träger für die zu kultivierenden Zellen (Zellträger) angeordnet werden kann, wobei durch Kanäle in jeder Kammer ein Zuführen und Abführen eines gasförmigen oder flüssigen Mediums möglich ist.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Kammer aufzuzeigen, die zugleich auch eine mikroskopische Beobachtung oder Untersuchung der Zellen auf einen Zellträger und/oder in Teilräumen der Kammer mit hoher Vergrößerung ermöglicht.

Zur Lösung dieser Aufgabe ist eine Kammer entsprechend dem kennzeichnenden Teil des Patentanspruchs 1 ausgebildet.

Die Erfindung hat den Vorteil, daß bei Beobachtung und Untersuchung mit optischen Mikroskopen sich extrem kleine Abstände zwischen dem Objektiv des verwendeten Mikroskops und den für die Untersuchung und Beobachtung interessierenden Ebenen innerhalb der Kammer erreichen lassen, die insbesondere die Innenfläche der den Innenraum der Kammer abschließenden Scheibe oder aber die Ebene eines in die Kammer eingebrachten Zellträgers sind. Diese geringen Abstände ergeben sich zum einen dadurch, daß der Dichtungsring zugleich eine Abdichtung im Bereich des Zellträgers oder eines dort vorgesehenen, den Zellträger aufweisenden Tragrings und zugleich auch im Bereich der Scheibe bewirkt. Wesentlich ist aber, daß bei dieser Konstruktion die Dicke der Scheibe extrem klein gehalten werden kann, da sich die Scheibe an ihrer dem Dichtungsring gegenüberliegenden Seite unmittelbar an der Abstützplatte abstützt, auf die Scheibe also ausschließlich senkrecht zur Ebene dieser Scheibe gerichtete Einspann- bzw. Druckkräfte wirken und keine Kräfte oder Momente, die ein Brechen der Scheibe verursachen würde. Die gleichen Vorteile gelten auch bei der Verwendung von Elektronenmikroskopen, Lasermikroskopen, mit Ultraschall- oder Infrarotlicht arbeitenden Beobachtungs- und Meßgeräten und Systemen.

Durch die Art der Befestigung ist die Scheibe auch auswechselbar, so daß den jeweiligen Anwendungszweck entsprechende Scheiben aus einem für die Anwendung optimalen Material eingesetzt werden können.

Bei der Erfindung kann die Kammer durch Abnehmen der Halteplatte geöffnet werden. Im geöffneten Zustand kann die Kammer dann z. B. mit der Öffnung auf chirurgische Operationsflächen aufgelegt werden, und zwar bei weiter durchgeführter Perfusion (Zuführen und Abführen von Medien über die Kanäle der Kammer). Hiermit hat das kultivierte Zellmaterial Gelegenheit optimal mit dem Körpergewebe zu verwachsen.

Weiterbildungen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

Die Erfindung wird im folgenden anhand der Figuren an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine Draufsicht auf eine Mikroskopkammer gemäß der Erfindung;

Fig. 2 in vereinfachter, vergrößerter Darstellung ei-

nen Schnitt entsprechend der Linie I-I der Fig. 1.

Die in den Figuren allgemein mit 1 bezeichnete Kammer, die zum Kultivieren von Zellen dient, auch als Perfusionskammer verwendbar ist sowie eine analytische Auswertung und Betrachtung mit hierfür geeigneten und bekannten Geräten und Systemen ermöglicht und die daher als Mikroskopkammer bezeichnet werden kann, besteht im wesentlichen aus einem scheibenförmigen Gehäuse 1 aus einem geeigneten Kunststoff.

Das Gehäuse 1 ist zweiteilig ausgebildet und besitzt ein unteres, napfartiges Gehäuseteil 2, welches einstückig mit einem Boden 3 und einem flachen Rand 4 hergestellt ist. Der Rand 4 umschließt eine kreisförmige Öffnung 5, in welche das im wesentlichen kreisscheibenförmige zweite Gehäuseteil 6 eingesetzt ist.

Zum Verriegeln des Gehäuseteils 6 in der Öffnung 5 des Gehäuseteils 1 dient ein aus einer Länge eines Metallstabes gebogener Bügel 7, der zwei parallele Schenkel 8 aufweist und mit diesen Schenkeln jeweils durch Bohrungen 9 des Randes 4 derart hindurchgeführt ist, daß die Ebene des Bügels 7 in etwa parallel zur Ebene der Unterseite des Bodens 3 liegt und jeder Schenkel 8 im Bereich einer Ausnehmung 10 gegen eine dem Boden 3 abgewandte Fläche 11 des Gehäuseteils 6 anliegt. Dadurch, daß die Schenkel 8 an ihren gegen die Fläche 11 anliegenden Seiten keilförmig abgeschrägt sind, liegt das Gehäuseteil 6 mit seiner Unterseite 6' angepreßt gegen die Bodenfläche 5' der Öffnung 5 an.

Am Boden 3 ist das Gehäuseteil mit einer mittigen, durchgehenden Öffnung 12 versehen, die mit einem Abschnitt 12' einen Teil des Innenraumes der Mikroskopkammer bildet und zur Unterseite des Bodens einen Abschnitt 12'' aufweist, der einen im Vergleich zum Abschnitt 12' größeren Durchmesser besitzt. Beide Abschnitte 12' und 12'' besitzen kreisförmige Querschnitte. In den Abschnitt 12' ist eine dünne Scheibe 13 eingesetzt, die den Boden des Innenraumes der Kammer bildet und aus einem licht- oder strahlendurchlässigen Material, z. B. Glas besteht. Die Dicke der Scheibe 13, die ein Betrachtungsfenster bildet, ist extrem gering, um extrem kleine optische Höhen und damit die angestrebte hohe Vergrößerung bei Betrachtung mit dem inversen Mikroskop, also von unten zu erreichen. Das Objektiv des inversen Mikroskops ist mit 14 angedeutet.

Die Innenseite der Scheibe 13 liegt gegen einen Dichtungsring 15 (O-Ring) an, welcher in den Abschnitt 12' der Bohrung 12 eingesetzt ist. Mit der der Scheibe 13 abgewandten Seite stützt sich der Dichtungsring 15 gegen einen Ring 16 ab, an dem ein Zellträger 17 gehalten ist.

Gegen die Unterseite der Scheibe 13 im Bereich des Randes dieser Scheibe liegt eine als flacher Ring ausgebildete Dichtung 18 an, die beispielsweise aus Silikon gummi oder einem anderen, geeigneten Material besteht. Gehalten ist die Scheibe 13 durch eine als Metallplatte ausgebildete Halteplatte 19, die mit dem Boden 3 des Gehäuseteils 2 in geeigneter Weise, beispielsweise durch Verschrauben verbunden ist. Die Halteplatte 19 besitzt eine kreisförmige Öffnung 20, die achsgleich mit der Längsachse L der Bohrung 12 angeordnet ist und das von der Scheibe gebildete Betrachtungsfenster freigibt und deren Durchmesser etwas größer ist als der Innendurchmesser des Dichtungsringes 15, aber kleiner ist als das arithmetische Mittel zwischen dem Innendurchmesser und dem Außendurchmesser des Dichtungsringes 15, so daß an der Unterseite des Gehäuseteils 2 die Glasplatte 13 über die Dichtung 18 auf jeden Fall dort durch die Halteplatte 19 abgestützt ist, wo der

Dichtungsring 15 gegen die Oberseite dieser Scheibe anliegt, so daß ausschließlich in Richtung der Dicke der Scheibe 13 wirkende Einspann- bzw. Druckkräfte auf die Scheibe einwirken, keinesfalls aber die Momente, die ein Brechen der dünnen Scheibe 13 bewirken könnten.

In gleicher Weise wie das untere Gehäuseteil 2 ist auch das obere Gehäuseteil 6 mit einer Bohrung 12a versehen, die bei geschlossenem Gehäuse 1 mit ihrer Achse achsgleich mit der Längsachse L des Gehäuseteils 2 liegt. In die Bohrung 12a, die wiederum einen dem Abschnitt 12' entsprechenden Abschnitt 12a' und einen dem Abschnitt 12'' entsprechenden Abschnitt 12a'' aufweist, ist ein dem Dichtungsring 15 entsprechender Dichtungsring 15a eingesetzt, der unten gegen den Ring 16 und oben gegen die Unterseite der Scheibe 13a anliegt. An der Oberseite ist die Scheibe 13a wiederum in gleicher Weise, wie dies für die Scheibe 13 beschrieben wurde, mittels einer Halteplatte 19a und einer dazwischenliegenden Dichtung 18a gehalten, so daß insoweit bezüglich der Scheiben 13, 13a, deren Befestigung und der Dichtungen 15, 15a eine symmetrisch zur Mittelebene M des Ringes 16 ausgebildete Konstruktion vorliegt. Die Unterseite der Scheibe 13a bildet die obere Begrenzung des Innenraumes der Kammer.

Wie die Fig. 2 weiterhin zeigt, sind durch die Dichtungen 15 und 15a jeweils sich radial zur Längsachse L erstreckende Kanülen 21 hindurchgeführt, die in Kanäle 22 im Gehäuseteil 2 bzw. 6 münden und über die das Zuführen oder Abführen von flüssigen oder gasförmigen Medien in die bzw. aus den oberhalb und unterhalb des Zellträgers 17 gebildeten Teilräumen möglich ist. Dies trägt ebenfalls zur flachen Bauform und damit zur Erzielung kleiner optischer Längen bei. Außerdem sind die Dichtungen durch die Kanülen 21 gesichert, wenn die Kammer geöffnet ist.

Mit 23 ist ein elektrischer Sensor bezeichnet, der an der Oberseite bzw. Innenfläche der Scheibe 13 angebracht ist. Die in der Regel mehradrige elektrische Verbindung 24 dieses Sensors 23 ist zwischen dem Dichtungsring 15 und der Innenfläche der Scheibe 13 aus dem Innenraum der Kammer herausgeführt. Durch den Sensor 23 ist eine Verbindung zwischen optischem und elektrischem Messen bzw. Beobachten möglich. Es ist beispielsweise möglich, anstelle des elektrischen Sensors 23 und/oder zusätzlich zu diesem einen optischen Sensor vorzusehen. Die Scheibe 13 kann an ihrer Innenfläche weiterhin mit Vertiefungen 25, beispielsweise in Form von Gräben oder Nuten versehen sein, die als Markierungen zur Erleichterung der mikroskopischen Beobachtungen dienen oder aber dazu dienen, um ein Anwachsen von Zellen zu ermöglichen oder zu erleichtern oder die Richtung der Ausbreitung der Zellen zu steuern.

Das Auswechseln der Scheiben 13 und 13a ist einfach und problemlos möglich. Anstelle von Glasscheiben können auch Scheiben aus einem anderen geeigneten Material, z. B. permeable Scheiben oder aber Scheiben aus einem als Substrat für ein Implantat geeigneten Material verwendet sein, beispielsweise für Knorpel- oder Knochenzellen. Weiterhin können die Scheiben 13 und 13a auch Membranen, beispielsweise gaspermeable Membranen oder Membranen sein, die ein Hindurchwachsen von Zellen ermöglichen. Die Dicke der Scheiben 13 und 13a liegt in der Größenordnung von etwa 0,1 mm. Hierdurch werden die extrem kurze optische Abstände zwischen dem für eine inverse Betrachtung vorgesehenen Objektiv 14 und der Innenfläche der

Scheibe 13, aber auch sehr kurze Abstände zwischen dem Objektiv 14 und der Ebene des Zellträgers 17 erreicht. Dadurch können Langzeitkulturen beobachtet und dann zum gegebenen Zeitpunkt, z. B. als Knochenzellen auf eine Bruchstelle einer Extremität des menschlichen Körpers aufgelegt werden.

Beispielsweise hormonproduzierende Zellen können mit der Kammer kultiviert werden und dann nach einer gewissen Zeit ausgesiedelt werden.

Über die Halteplatten 19 und/oder über den Verschlussbügel 8 ist eine Beheizung der Kammer bzw. des von den Abschnitten 12' und 12a' gebildeten Innenraumes möglich.

Bei der dargestellten Ausführungsform erstreckt sich die Halteplatte 19 über die gesamte Unterseite des Bodens 3. Die Platte 19 ist dort entweder durch Schrauben oder andere mechanische Befestigungsmitteln oder aber durch Adhäsion gehalten. Für die Befestigung der Platte 19 kann auch ein Unterdruck verwendet werden. In diesem Fall ist in die Unterseite des Bodens 3 ein zu dieser Unterseite hin offener, die Achse L konzentrisch umschließender Kanal 26 eingebracht, der über einen Anschluß 27 mit einem die Platte 19 haltenden Unterdruck beaufschlagbar ist.

Bezugszeichenliste

- 1 Gehäuse
- 2 Gehäuseteil
- 3 Boden
- 4 Rand
- 5 Öffnung
- 5' Bodenfläche
- 6 Gehäuseteil
- 7 Bügel
- 8 Bügelschenkel
- 9 Bohrung
- 10 Ausnehmung
- 11 Fläche
- 12, 12a Bohrung
- 12', 12'' Bohrungsabschnitt
- 12a', 12a'' Bohrungsabschnitt
- 13 Scheibe
- 14 inverses Objektiv
- 15 Dichtungsring
- 16 Ring
- 17 Zellträger
- 18 Dichtung
- 19 Halteplatte
- 20 Öffnung
- 21 Kanüle
- 22 Kanal
- 23 Sensor
- 24 elektrische Verbindung
- 25 Vertiefung
- 26 Kanal
- 27 Anschluß.

Patentansprüche

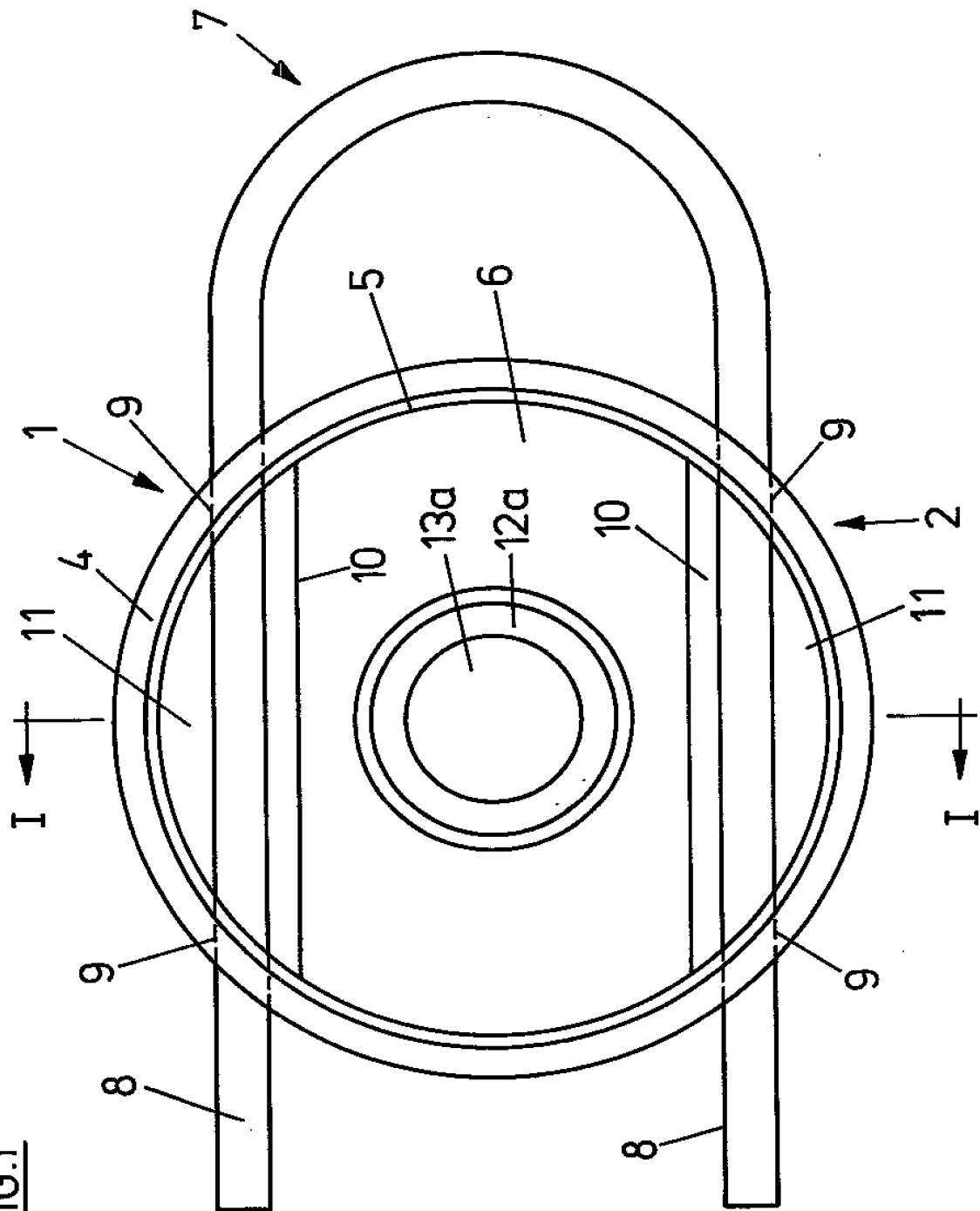
1. Kammer zur Kultivierung von Zellen, insbesondere Mikroskopkammer, bestehend aus einem mehrteiligen Gehäuse (1) mit wenigstens einem ersten Gehäuseteil (2) und einem zweiten Gehäuseteil (6), die jeweils eine Bohrung oder Ausnehmung (12, 12a) aufweisen, die bei geschlossenem Gehäuse achsgleich angeordnet sind und jeweils einen Teil eines Innenraumes der Kammer bilden, wobei in

- wenigstens einer Ausnehmung (12, 12a) ein die Achse dieser Ausnehmung umschließender Dichtungsring (15, 15a) vorgesehen ist, der gegen die Innenfläche einer den Innenraum der Kammer nach außen abschließenden und ein Betrachtungsfenster bildenden Scheibe (13, 13a) anliegt, **dadurch gekennzeichnet**, daß sich die Scheibe (13, 13a) an der dem Innenraum der Kammer abgewandten Außenfläche und der Anlagefläche des Dichtungsringes (15, 15a) direkt gegenüberliegend an einer Halteplatte (19, 19a) abstützt, die eine das Betrachtungsfenster freigebende Öffnung (20) besitzt und abnehmbar an dem Gehäuseteil (2, 6) befestigt ist.
2. Kammer nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zwischen der Außenfläche der Scheibe (13) und der Halteplatte (19, 19a) ein die Öffnung (20) umschließender flacher Ring (18, 18a) aus einem elastischen Material vorgesehen ist.
3. Kammer nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Abstütz- oder Halteplatte (19, 19a) aus einem Material mit hoher Wärmeleitfähigkeit besteht.
4. Kammer nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Abstütz- oder Halteplatte (19, 19a) eine Metallplatte ist.
5. Kammer nach einem der Ansprüche 1–4, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch den Dichtungsring (15, 15a) wenigstens ein Kanal (21) für ein flüssiges oder gasförmiges Medium hindurchgeführt ist.
6. Kammer nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kanal rohrförmig oder schlitzförmig ausgebildet ist und vorzugsweise von einem Rohrstück mit rundem oder ovalem Querschnitt gebildet ist.
7. Kammer nach einem der Ansprüche 1–6, **dadurch gekennzeichnet**, daß beide Gehäuseteile (2, 6) bezüglich der Halterung und Abdichtung der den Innenraum der Kammer begrenzenden Scheiben (13, 13a) symmetrisch ausgebildet sind.
8. Kammer nach einem der Ansprüche 1–7, **dadurch gekennzeichnet**, daß wenigstens eine Scheibe (13, 13a) an der Innenfläche Vertiefungen (25) oder Markierungen aufweist.
9. Kammer nach einem der Ansprüche 1–8, **dadurch gekennzeichnet**, daß an der Innenfläche wenigstens einer Scheibe (13, 13a) wenigstens ein elektrischer und/oder optischer Sensor (23) angeordnet ist.
10. Kammer nach einem der Ansprüche 1–9, **dadurch gekennzeichnet**, daß wenigstens eine Scheibe (13, 13a) aus einem permeablen Material besteht.
11. Kammer nach einem der Ansprüche 1–10, **dadurch gekennzeichnet**, daß wenigstens eine Scheibe (13, 13a) austauschbar ist.
12. Kammer nach einem der Ansprüche 1–11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Halte- oder Abstützplatte für die wenigstens eine Scheibe (13, 13a) beheizbar ist.
13. Kammer nach einem der Ansprüche 1–12, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Innenraum einen zylinderförmigen Querschnitt aufweist.
14. Kammer nach einem der Ansprüche 1–13, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Innenraum einen quadratischen oder rechteckförmigen Querschnitt aufweist.
15. Kammer nach einem der Ansprüche 1–14, da-

durch gekennzeichnet, daß die Halteplatte (19) durch Adhäsion oder mittels Unterdruck am Gehäuseteil (2, 6) gehalten ist.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

FIG.1



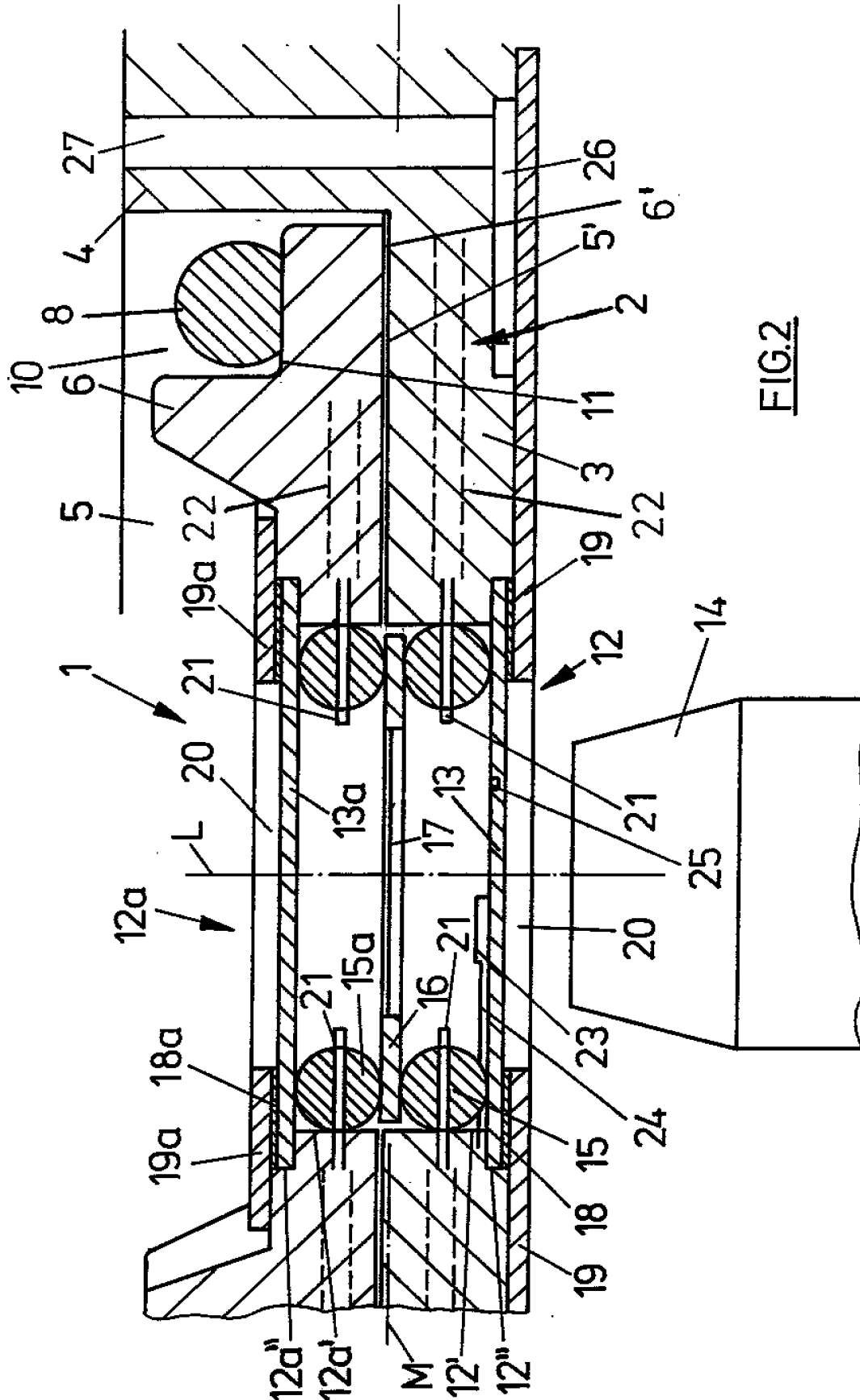


FIG.2